·论著·

基于网络药理学方法探析汉黄芩素治疗肝细胞癌作用机制和体外实验研究

杨安银[1]，刘红丽[2]，陈妙洋[1]，郑玉凤[1]，徐志远[3]，杨永峰[1*]

1.210000 江苏省南京市，南京中医药大学附属南京医院 南京市第二医院肝病科
2.210000 江苏省南京市，东南大学医学院
3.210000 江苏省南京市，南京医科大学公共卫生学院
*通信作者：杨永峰，主任医师/博士生导师；E-mail：1997@163.com

【摘要】 **背景** 肝细胞癌是癌症相关死亡的主要原因，目前的防治形势依然严峻，对新的肝细胞癌治疗药物进行探索研究具有科学意义。**目的** 通过网络药理学方法分析汉黄芩素干预肝细胞癌的作用机制，并进行体外实验验证。**方法** 在 TCMSP 数据库中检索汉黄芩素的药物靶点，从 TTD、GenCard、OMIM、DisGent 数据库中收集肝细胞癌的疾病靶点。将收集的药物靶点和疾病靶点取交集，作为药物干预疾病的潜在靶点。对交集靶点运用 R 软件进行富集分析，使用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件对交集靶点构建蛋白互作网络和筛选核心靶点。在 GIEPA 数据库对核心靶点进行近一步分析。最后通过体外实验对前期分析结果进行验证：采用 CCK-8 试剂盒测定细胞活性；采用平板克隆形成实验测定细胞增殖；采用划痕实验测定细胞迁移；采用 Western-blotting（WB）实验测定蛋白质表达水平。**结果** 分析结果发现汉黄芩素的 AMDE 特性符合小分子药物成药规则并且毒性分析结果表明无毒性。收集到汉黄芩素靶点 135 个，肝细胞癌靶点 8 238 个，两者交集靶点 113 个。通过对构建的蛋白互作网络筛选出的 TOP10 的核心基因进行分析，发现 CDK1、SRC 在肝癌组织中 mRNA 水平较正常肝组织上调（$P<0.05$），并且在肝癌患者中高表达与不良预后相关（$P<0.05$）。KEGG 富集分析发现交集基因富集在 PI3K/AKT 信号通路上最多，分子对接结果显示汉黄芩素与 CDK1、SRC 结合构型活力较强。CCK-8 试剂盒检测结果显示，加入汉黄芩素 75、150、300.0 μmol/L 组 HepG2 细胞活性均低于对照组（$P<0.05$）；平板克隆形成实验结果显示，加入汉黄芩素 37.5、75、150.0 μmol/L 组 HepG2 细胞克隆形成数均低于对照组（$P<0.05$）；划痕实验结果表明，加入汉黄芩素 37.5、75、150.0 μmol/L 组 HepG2 细胞迁移率均低于对照组（$P<0.05$）；WB 实验结果表明，加入汉黄芩素 75、150.0 μmol/L 组 PI3K、P-AKT/AKT、CDK1、SRC 蛋白表达水平均低于对照组（$P<0.05$）。**结论** 汉黄芩素通过下调 CDK1、SRC 蛋白表达，减弱 PI3K/AKT 通路信号，抑制肝癌细胞增殖和迁移，诱导细胞凋亡，从而达到干预肝细胞癌发生和进展的目的。

【关键词】 癌，肝细胞；汉黄芩素；网络药理学；体外实验
【中图分类号】 R 730.261 【文献标识码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0238

Mechanism and in Vitro Experiment of Wogonin in Treatment of Hepatocellular Carcinoma Based on Network Pharmacology

YANG Anyin[1]，*LIU Hongli*[2]，*CHEN Miaoyang*[1]，*ZHENG Yufeng*[1]，*XU Zhiyuan*[3]，*YANG Yongfeng*[1*]
1.*Department of Liver Disease*，*Second Hospital of Nanjing*，*Nanjing University of Chinese Medicine*，*Nanjing* 210000，*China*
2.*Southeast University School of Medicine*，*Nanjing* 210000，*China*
3.*School of Public Health*，*Nanjing Medical University*，*Nanjing* 210000，*China*
**Corresponding author*：*YANG Yongfeng*，*Chief physician/Doctoral supervisor*；*E-mail*：1997@163.com

【Abstract】 **Background** Hepatocellular carcinoma（HCC） is the leading cause of cancer-related deaths. The current prevention and treatment situation remains critical. It is of scientific significance to explore new therapeutic agents for HCC. **Objective** To analyze the mechanism of wogonin on HCC by network pharmacology and to verify it in vitro. **Methods** The

基金项目：国家自然科学基金面上项目（81970454）
引用本文：杨安银，刘红丽，陈妙洋，等.基于网络药理学方法探析汉黄芩素治疗肝细胞癌作用机制和体外实验研究［J］.中国全科医学，2023.［Epub ahead of print］. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0238.［www.chinagp.net］
YANG A Y，LIU H L，CHEN M Y，et al. Mechanism and in vitro experiment of wogonin in treatment of hepatocellular carcinoma based on network pharmacology［J］. Chinese General Practice，2023.［Epub ahead of print］.

drug targets of wogonin were searched in TCMSP database, and the disease targets of HCC were collected from TTD, GenCard, OMIM, DisGent databases. The collected drug targets and disease targets were intersected as potential targets for drug intervention in diseases. R software was used for enrichment analysis of intersection targets, STRING database and Cytoscape software were used to construct protein interaction network and screen core targets. The core targets were further analyzed in GIEPA database. Finally, the preliminary analysis results were verified by in vitro experiments, including cell activity determination using CCK-8 kit, cell proliferation determination using plate clone formation experiment, cell migration determination using scoring test, protein expression level determination using Western-blotting (WB) assay. **Results** The AMDE characteristics of wogonin were found to be in accordance with the rules for small molecule drug formation and the toxicity analysis showed no toxicity. A total of 135 wogonin targets and 8238 HCC targets were collected, and 113 targets were intersected. Through the analysis of the core genes of TOP10 screened by the constructed protein interaction network, it was found that the mRNA levels of CDK1 and SRC in liver cancer tissues were higher than those in normal liver tissues ($P<0.05$), and the high expression levels in liver cancer patients were related to poor prognosis ($P<0.05$). KEGG enrichment analysis showed that the intersection genes were enriched in the PI3K/AKT signaling pathway, and the molecular docking results showed that wogonin had strong binding configuration activity with CDK1 and SRC. The results of CCK-8 kit showed that the activity of HepG2 cells in the 75, 150, and 300.0 μmol/L wogonin groups was lower than that in the control group ($P<0.05$). The results of plate clone formation experiment showed that the number of colony formation of HepG2 cells in the 37.5, 75, 150.0 μmol/L wogonin groups was lower than that in the control group ($P<0.05$). The results of scoring test showed that the migration rate of HepG2 cells in the 37.5, 75 and 150.0 μmol/L wogonin groups was lower than that in the control group ($P<0.05$). The results of the WB assay showed that the expression levels of PI3K, P-AKT/AKT, CDK1 and SRC proteins in the 75 and 150.0 μmol/L wogonin groups were lower than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Wogonin inhibits the proliferation and migration of HCC cells and induces apoptosis by down-regulating the expression of CDK1 and SRC proteins and attenuating the PI3K/AKT pathway signaling, to achieve the purpose of interfering with the occurrence and progression of HCC.

【Key words】 Carcinoma, hepatocellular; Wogonin; Network pharmacology; In vitro experiments

肝细胞癌（HCC）占原发性肝癌的大多数，是世界上许多地区癌症相关死亡的主要原因[1]。在多数亚洲国家、美国和欧盟批准 Sorafenib 和 lenvatinib 为 HCC 的一线治疗药物[2]。在过去的 20 年，学者研究了 HCC 的临床管理，显著改善了治疗方案，其中包括新的药物组合。尽管已经取得了相当大的进展，但 HCC 的总体结果仍远不能令人满意[3]。所以对新的 HCC 治疗方法进行探索研究是具有科学意义的。

药物治疗是癌症治疗的重要方法[4-5]。在药物研发的过程中，临床前研究的先导化合物筛选起着至关重要的作用[6-7]。植物因为产生了许多具有药理活性的代谢产物，是药物研发中先导化合物的重要资源[8]。但是传统的先导化合物筛选方法周期长，工作量大并且价格昂贵[9-10]，网络药理学的发展，为从药用植物的有效成分中先导化合物的筛选开辟了新的途径[11]。

汉黄芩素（wogonin）是一种黄酮类天然化合物，是黄芩属植物的主要活性成分[12]。在以前的研究表明汉黄芩素具有良好的抗肿瘤活性[13]。本研究旨在通过网络药理学方法分析汉黄芩素治疗 HCC 的作用机制，并通过体外实验进行验证，期望为 HCC 新的治疗选择进行探索。

1 材料与方法

1.1 汉黄芩素 AMDE 及毒性预测

在 Pubchem 数据库中收集汉黄芩素的 SMILES 式，将检索到的 SMILES 分别导入 SWISS AMDE 在线服务网站（http://www.swissadme.ch/）分析汉黄芩素的吸收、分布、代谢、排泄（AMDE）特性及生物利用度。导入 ProTox-II-Prediction of TOXicity of Chemicals 在线服务网站（https://tox-new.charite.de/protox_II/index.php?site=compound_input）预测汉黄芩素的肝毒性、致癌性、致突变性、免疫毒性、细胞毒性。

1.2 汉黄芩素及肝细胞癌靶点收集

在 TCMSP 数据库（https://tcmsp-e.com/tcmsp.php）中检索“wogonin”，收集汉黄芩素药物靶点。以关键词“hepatocellular carcinoma”在 TTD（https://db.idrblab.net/ttd/）、GenCards（https://www.genecards.org/）、OMIM（https://www.omim.org/）、DisGnet（https://www.disgenet.org/）数据库中检索并收集 HCC 疾病靶点。将药物靶点与疾病靶点取交集，获得药物干预疾病的潜在靶点。

1.3 蛋白互作网络构建和核心靶点筛选

将药物干预疾病潜在靶点导入 STRING 数据库（https://cn.string-db.org/），选择物种为“Homo sapiens”，设置 required score 为“highest confidence（0.900）”构建蛋白互作网络。将蛋白互作网络导入

Cytoscape 3.9.0 软件（隐藏连接度为 0 的节点），并使用“Cytohubba”插件筛选出 TOP 10 的基因，然后使用 GIEPA 数据库（http://gepia2.cancer-pku.cn/#index）分析核心基因在肝癌组织和正常肝组织中 mRNA 表达水平（|logFC|>1 和 P<0.05 表示基因有显著差异）以及核心基因与肝癌患者生存预后的关联（logrank P<0.05 视为有统计学差异）。

1.4 基因本体（GO）和京都基因与基因组百科全书（KEGG）富集分析

在 R 软件中使用“clusterProfiler”包进行 GO 和 KEGG 富集分析，P<0.01 视为具有显著性。利用“ggplot2”包对分析结果进行可视化。

1.5 分子对接

在 PDB 数据库（https://www.rcsb.org/）中下载核心基因的蛋白三维结构，并在 Pymol 软件中完成移除水分子和小分子配体。在 Pubchem 数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）中下载汉黄芩素的化合物 3D 结构，使用 Chem3D 软件将能量最小化。最后使用 Autodock vina 进行分子对接并在 pymol 中将对接结果可视化。

1.6 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG2（中乔新舟）和人正常细胞株 LO_2（中乔新舟）完全培养基条件为 MEM（含 NEAA）培养基 90%+ 胎牛血清（FBS）10%。培养条件为 5% CO_2、37 ℃。

1.7 CCK-8 试剂盒测定细胞活性

将细胞按 1×10^4 个 / 孔接种于 96 细胞培养板中，在 5% CO_2、37 ℃培养条件下过夜。移除培养基，每孔加入 100 μL PBS 洗涤，重复 2 次。每孔加入 200 μL 含汉黄芩素浓度分别为 0、18.5、37.5、75.0、150.0、300.0 μmol/L 的完全培养基，分别处理 24、48、72 h。移除培养基，每孔加入 100 μL PBS 洗涤两次。将 CCK-8 试剂（普诺恩）按 10% 溶解于完全培养基中，每孔加入 100 μL。在 5% CO_2、37 ℃条件下孵育 2 h。在酶标仪 450 nm 波长下检测吸光度（OD 值）。

1.8 平板克隆形成实验

HepG2 细胞按 500 个 / 孔接种于 6 孔细胞培养板中，5% CO_2、37 ℃条件下孵育过夜。移除培养基，加入 2 mL PBS 洗涤 2 次。加入含汉黄芩素浓度分别为 0、37.5、75.0、150.0 μmol/L 的完全培养基，孵育 48 h 后，移除培养基，加入 2 mL PBS 洗涤 2 次。加入完全培养基，3 d 换液 1 次，连续培养 14 d。移除培养基，加入 2 mL PBS 洗涤 2 次，加入多聚甲醛固定 25~30 min，使用结晶紫染色，拍照。

1.9 划痕实验

HepG2 细胞按 5×10^5 个 / 孔接种于 6 孔板中，培养至细胞完全融合后，使用无菌 100 μL 移液器枪头划伤层细胞，加入 2 mL PBS 洗涤 2 次，加入含汉黄芩素浓度分别为 0、37.5、75.0、150.0 μmol/L 的无血清培养基，分别在 0 h 和 48 h 对划痕进行拍照，使用 Image J 软件进行分析。细胞迁移率为划痕恢复距离相对于原始距离。

1.10 细胞凋亡

HepG2 细胞按 2×10^5 个 / 孔接种于 24 孔板中，加入含汉黄芩素浓度分别为 0、37.5、75.0、150.0 μmol/L 的完全培养基进行处理 24 h，使用 Annexin V-FITC 试剂盒检测细胞凋亡。在荧光显微镜下对细胞加入 Annexin V-FITC 试剂的细胞进行拍照，绿色荧光信号越强，代表细胞凋亡越多。

1.11 蛋白质免疫印迹

加入含汉黄芩素浓度分别为 0、37.5、75.0、150.0 μmol/L 的完全培养基处理 HepG2 细胞 48 h。使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液（碧云天）分离总蛋白，BCA 蛋白检测试剂盒（碧云天）检测蛋白浓度。10% SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h，然后，将膜与一抗 4 ℃孵育过夜。再次与 IgG 偶联二抗在室温下孵育 2 h。最后，用 ELC 检测蛋白条带。

1.12 统计学方法

数据以（$\bar{x}\pm s$）表示（所有实验重复 3 次）。采用 Graph Pad Prism 软件进行分析和作图。多组间比较采用单因素方差分析（ANOVA）。两组间比较采用 t 检验，以 P<0.05 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 汉黄芩素 AMDE 及毒性预测结果

SWISS AMDE 和 ProTox-II-Prediction of TOXicity of Chemicals 在线服务网站对汉黄芩素分析结果（图 1）显示：分子式：C16H12O5，分子量（MW）：284.26，可旋转键（Rotatable bonds）：2，氢键受体（H-bond acceptors）：5，氢键供体（H-bond donors）：2，脂水分配系数（MLOGP）：0.77，生物利用度（GI absorption）较高。肝毒性、致癌性、致突变性、免疫毒性、细胞毒性均为无活性的（Inactive）。

2.2 汉黄芩素及肝细胞癌靶点

在 TCMSP 数据库中收集到汉黄芩素靶点 135 个，在 TTD，GeneCards，OMIM，DisGenet 数据库中收集到肝细胞癌靶点 8238 个。将化合物与疾病交集靶点 113 个作为汉黄芩素干预肝细胞癌的潜在靶点（图 2）。

2.3 汉黄芩素干预肝细胞癌潜在靶点蛋白互作网络构建及核心靶点筛选

将化合物与疾病交集靶点导入 STRING 数据库，得到 92 个节点（隐藏连接度为 0 的节点），265 条边的蛋白互作网络（图 3）。使用 Cytoscape 软件中的

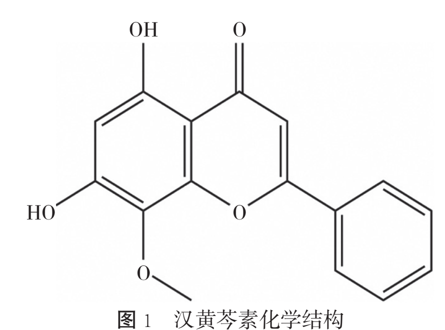


图 1　汉黄芩素化学结构

Figure 1　Chemical structure of wogonin

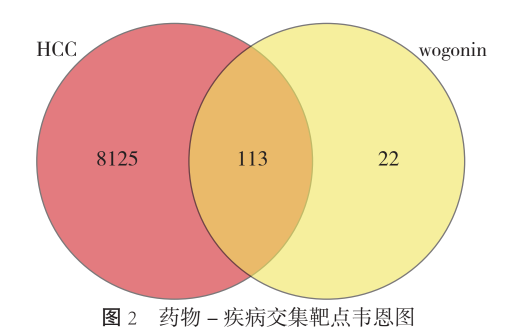


图 2　药物－疾病交集靶点韦恩图

Figure 2　Venn diagram of drug-disease intersection targets

"Cytohubba"插件的"MCC"算法获得 TOP10 的核心靶点，分别为原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src（SRC），HSP90AA1 热休克蛋白 HSP90-α（HSP90AA1），细胞肿瘤抗原 p53（TP53），细胞周期蛋白依赖性激酶 1（CDK1），丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶（AKT1），G1/S- 特异性周期蛋白 -D1（CCND1），转录因子 Jun（JUN），RELA 原癌基因（RELA），一氧化氮合酶（NOS2），细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1（CDKN1A）（图 4）。在 GEIPA 数据中基于 TCGA 数据库中的数据对核心基因在肝癌患者及正常肝组织中 mRNA 表达水平（图 5）进行分析发现：CDK1 和 SRC 在肝癌组织中表达水平高于正常肝组织（P<0.05）。CDK1、HSP90AA1、RELA、SRC、JUN 在肝癌患者中高表达与不良预后相关（图 6）（P<0.05）。

2.4　GO 和 KEGG 富集分析

GO 富集（图 7A）分析显示，交集基因主要富集的生物学过程（BP）有抗氧化反应（response to oxidative stress），细胞对化学应激的响应（cellular response to chemical stress），对辐射的响应（response to radiation）等，富集的细胞组分（CC）有膜筏（membrane raft），膜微结构域（membrane microdomain）等，分子功能主要富集在蛋白质丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性（protein serine/threonine kinase activity），跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性（transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity），胆酸结合作用（bile acid binding）等。KEGG 通路富集（图 7B）分析中交集基因主要富集的通路有

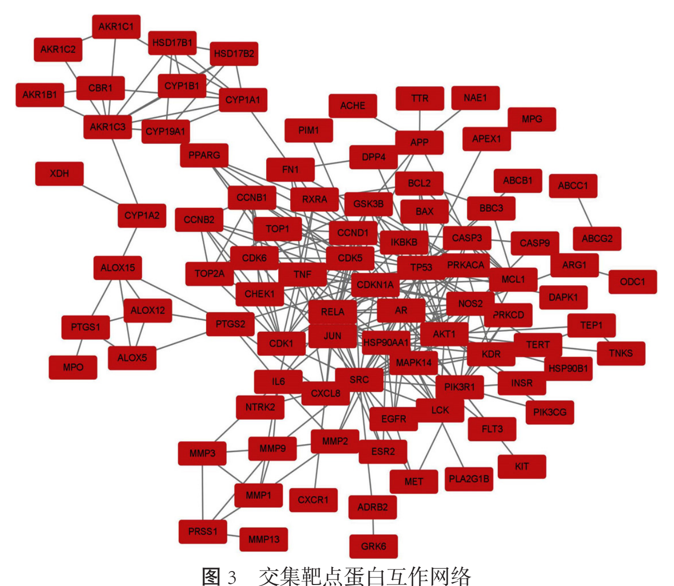


图 3　交集靶点蛋白互作网络

Figure 3　Intersection target protein interaction network

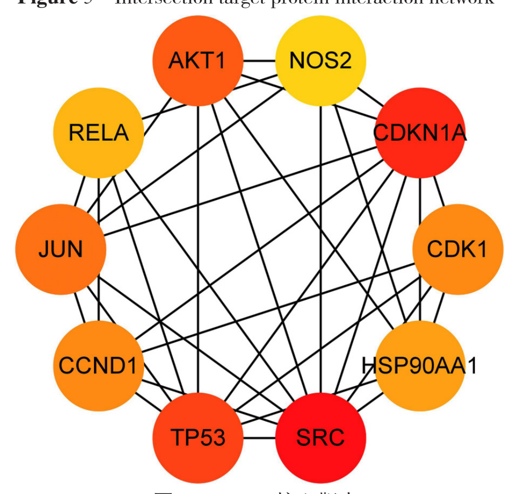


图 4　TOP10 核心靶点

Figure 4　TOP10 core targets

PI3K/AKT 信号通路（PI3K-Akt signaling pathway），p53 信号通路（p53 signaling pathway），IL-17 信号通路（IL-17 signaling pathway）等。

2.5　分子对接

将核心靶点 CDK1 和 SRC 的三维蛋白质结构与汉黄芩素化合物三维结构使用 Autodock vina 进行分子对接，结果显示 CDK1、SRC 与汉黄芩素的结合能均低于 -7 kcal/mol，证明蛋白质与化合物结合构型活性较强（图 8）。

2.6　汉黄芩素抑制肝癌细胞增殖

使用 CCK-8 试剂盒检测汉黄芩素对肝癌细胞增殖影响发现，24、48、72 h 时，各组 HepG2 细胞活性比较，差异有统计学意义（P<0.05），见表 1。在相同浓度和时间梯度下，HepG2 细胞活性低于 LO_2 细胞活性，差异有统计学意义（P<0.05），见表 2~4。平板克隆形成实验结果显示，各组 HepG2 细胞克隆形成数比较，差异

表 1 汉黄芩素处理后 HepG2 细胞活性（$\bar{x} \pm s$）

Table 1 Activity of HepG2 cells treated with wogonin

组别	例数	24 h	48 h	72 h
0 μmol/L	3	1.608 ± 0.092	1.473 ± 0.086	1.642 ± 0.087
DMSO 溶媒组	3	1.562 ± 0.071	1.459 ± 0.106	1.641 ± 0.089
18.5 μmol/L	3	1.344 ± 0.112[a]	1.459 ± 0.117	1.655 ± 0.101
37.5 μmol/L	3	0.922 ± 0.108[a]	1.322 ± 0.081[a]	1.630 ± 0.161
75.0 μmol/L	3	0.818 ± 0.022[a]	0.976 ± 0.081[a]	1.317 ± 0.042[a]
150.0 μmol/L	3	0.737 ± 0.017[a]	0.389 ± 0.015[a]	0.261 ± 0.043[a]
300.0 μmol/L	3	0.637 ± 0.018[a]	0.361 ± 0.029[a]	0.223 ± 0.036[a]
F 值		148.5	178.1	271.2
P 值		<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注：[a] 表示与对照组相比 *P*<0.05。

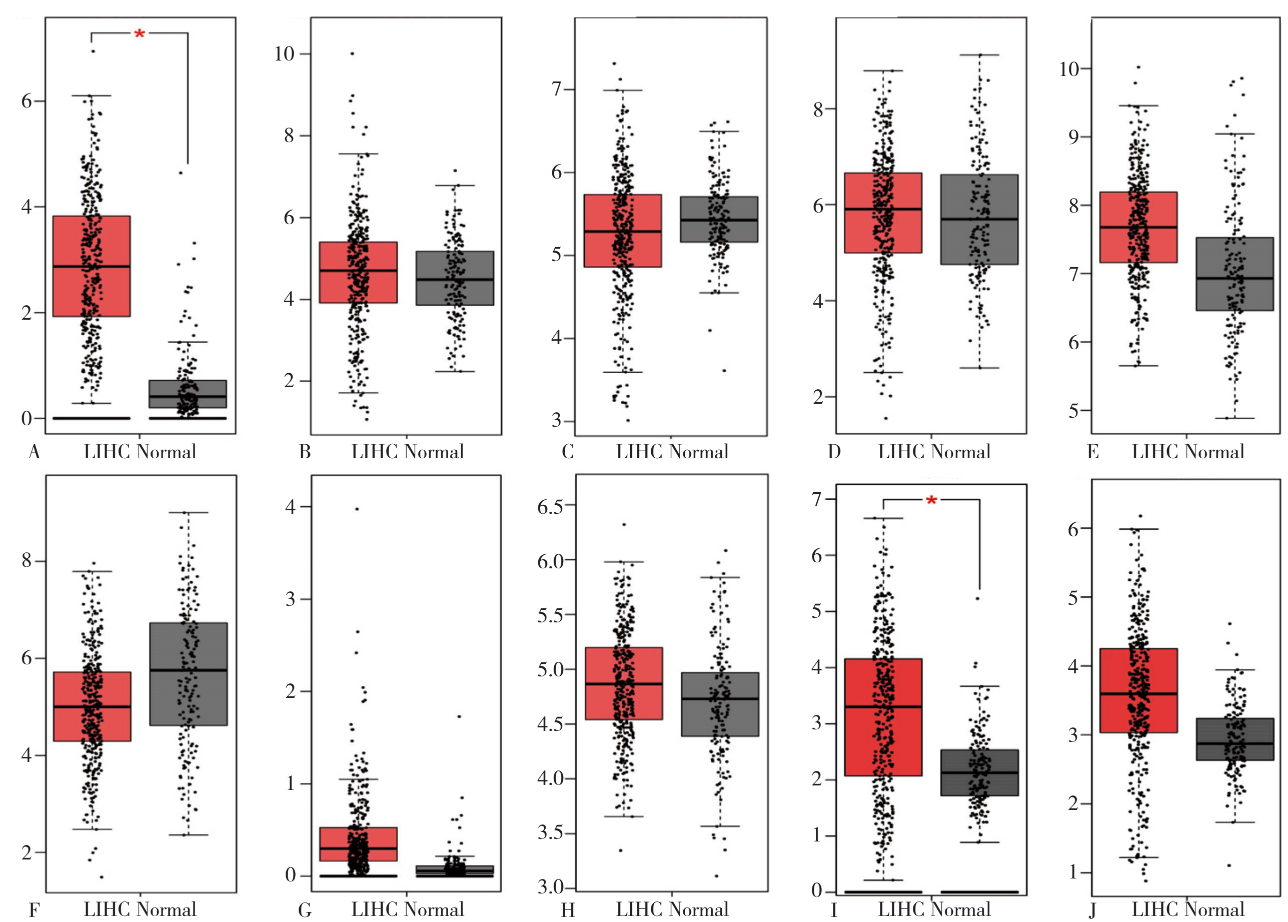
有统计学意义（*P*<0.05），见图 9、表 5。

2.7 汉黄芩素抑制肝癌细胞迁移和诱导肝癌细胞凋亡

划痕实验结果表明，各组 HepG2 细胞迁移率比较，差异有统计学意义（*P*<0.05），见图 10、表 6。HepG2 细胞在一定浓度的汉黄芩素的处理后，使用 Annexin V-FITC 试剂盒在荧光显微镜下观察发现，随着汉黄芩素的浓度升高，绿色荧光信号增强，说明细胞凋亡数量增加（图 11）。

2.8 汉黄芩素抑制核心靶点 CDK1、SRC 表达和减弱 PI3K/AKT 信号通路

WB 实验结果表明，一定浓度范围内，汉黄芩素能



注：A~J 分别代表 CDK1、CCND1、AKT1、CDKN1A、HSP90AA1、JUN、NOS2、RELA、SRC、TP53 在肝癌组织和正常肝组织中的 mRNA 表达水平；[*]*P*<0.05，[**]*P*<0.01；LIHC= 肝细胞癌，Normal= 正常肝组织。

图 5 GEPIA 数据库验证核心靶点在肝细胞癌和正常肝组织中 mRNA 表达水平

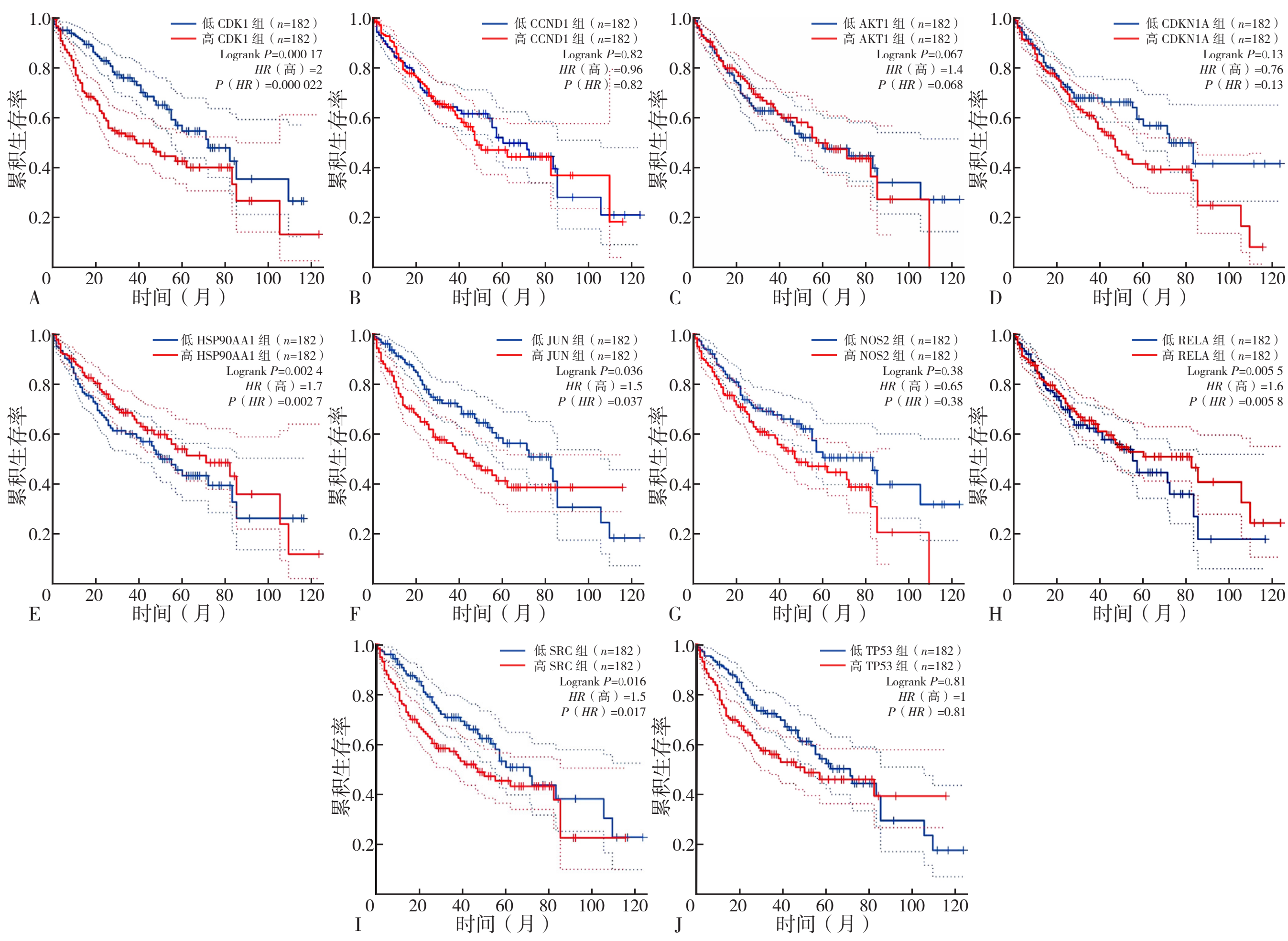
Figure 5 The GEPIA database verified the mRNA expression levels of core targets in hepatocellular carcinoma and normal liver tissues

表 2 汉黄芩素处理 24 h 后，相同浓度下 HepG2 细胞与 LO_2 细胞活性比较（$\bar{x} \pm s$）

Table 2 Comparison of the activity of HepG2 cells and LO_2 cells at the same concentration after 24 h treatment with wogonin

组别	例数	18.5 μmol/L	37.5 μmol/L	75.0 μmol/L	150.0 μmol/L	300.0 μmol/L
HepG2 细胞活性	3	83.45 ± 2.96	57.67 ± 9.28	51.18 ± 4.56	45.97 ± 3.35	39.71 ± 2.90
LO_2 细胞活性	3	113.41 ± 5.68	108.77 ± 4.54	106.06 ± 4.54	82.75 ± 3.92	61.92 ± 3.33
t 值		10.06	11.06	17.57	15.96	11.23
P 值		<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注：细胞活性为实验组与空白对照组（设空白对照组细胞活性为 100）进行比较。



注：A 为 CDK1，logrank P=0.000 17；B 为 CCND1，logrank P=0.82；C 为 AKT1，logrank P=0.067；D 为 CDKN1A，logrank P=0.13；E 为 HSP90AA1，logrank P=0.002 4；F 为 JUN，logrank P=0.036；G 为 NOS2，logrank P=0.38；H 为 RELA，logrank P=0.005 5；I 为 SRC，logrank P=0.016；J 为 TP53，logrank P=0.81。

图 6 GEPIA 数据库对 TOP10 核心靶点在肝癌患者中的生存分析

Figure 6 Survival analysis of TOP10 core targets in hepatocellular carcinoma patients by the GEPIA database

表 3 汉黄芩素处理 48 h 后，相同浓度下 HepG2 细胞与 LO_2 细胞活性比较（$\bar{x} \pm s$）

Table 3 Comparison of the activity of HepG2 cells and LO_2 cells at the same concentration after 48 h treatment with wogonin

组别	例数	18.5 μmol/L	37.5 μmol/L	75.0 μmol/L	150.0 μmol/L	300.0 μmol/L
HepG2 细胞活性	3	95.23 ± 4.91	91.97 ± 2.40	51.05 ± 2.83	24.11 ± 1.30	13.90 ± 0.80
LO_2 细胞活性	3	99.26 ± 9.30	90.04 ± 8.39	66.62 ± 9.30	26.48 ± 1.75	24.62 ± 2.47
t 值		0.857	0.496	3.587	2.428	9.237
P 值		0.416	0.633	0.007	0.041	<0.0001

注：细胞活性为实验组与空白对照组（设空白对照组细胞活性为 100）进行比较。

表 4 汉黄芩素处理 72 h 后，相同浓度下 HepG2 细胞与 LO_2 细胞活性比较（$\bar{x} \pm s$）

Table 4 Comparison of the activity of HepG2 cells and LO_2 cells at the same concentration after 72 h treatment with wogonin

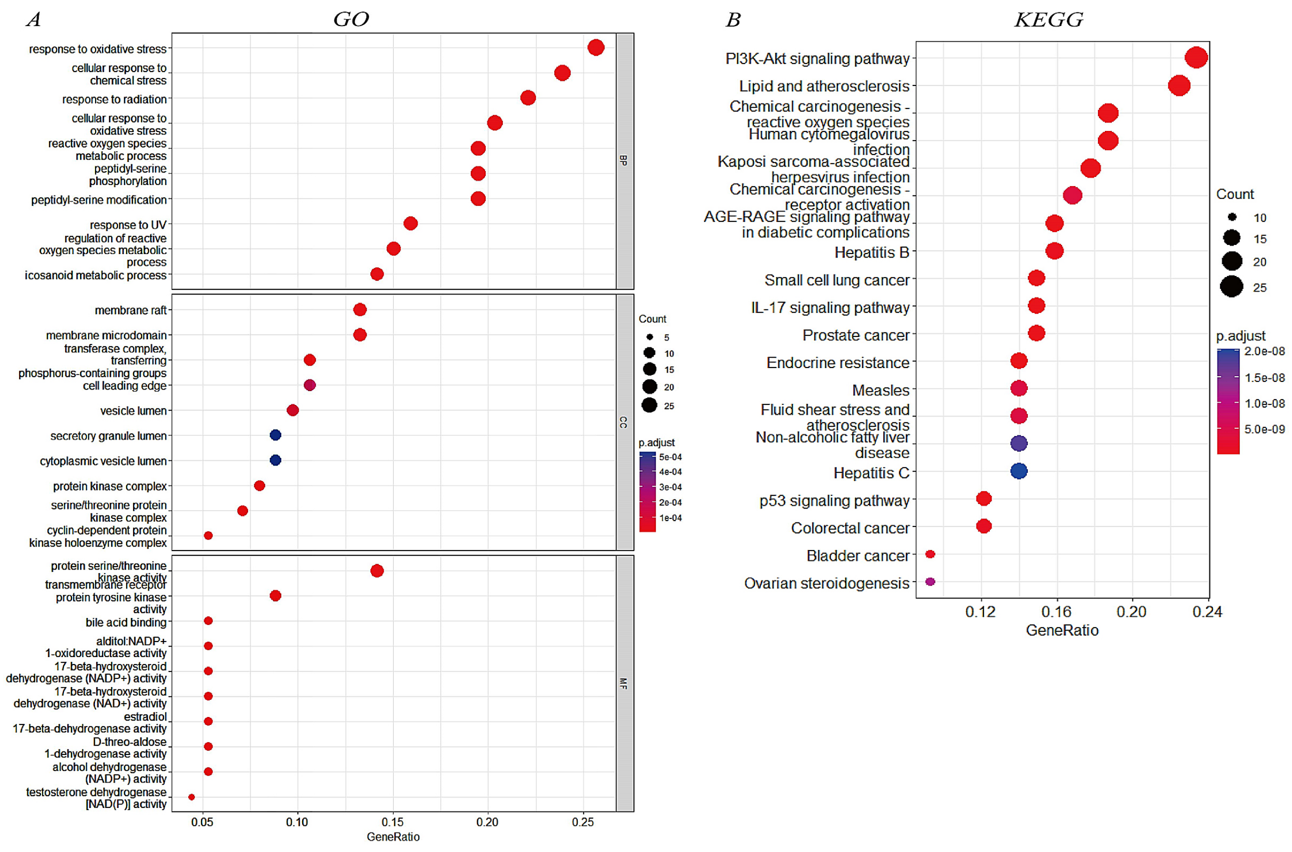
组别	例数	18.5 μmol/L	37.5 μmol/L	75.0 μmol/L	150.0 μmol/L	300.0 μmol/L
HepG2 细胞活性	3	79.08 ± 5.85	72.73 ± 1.50	65.80 ± 2.43	37.89 ± 2.68	26.71 ± 2.74
LO_2 细胞活性	3	100.79 ± 3.38	99.17 ± 7.47	80.32 ± 3.23	41.55 ± 1.97	34.45 ± 3.76
t 值		7.182	7.764	8.029	2.460	3.721
P 值		<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.039	0.005

注：细胞活性为实验组与空白对照组（设空白对照组细胞活性为 100）进行比较。

够下调核心靶点 CDK1 和 SRC 的表达水平。PI3K，P-AKT 蛋白表达下调，总 AKT 蛋白表达无影响，表明汉黄芩素能够减弱 PI3K/AKT 信号通路（图 12，表 7）。

3 讨论

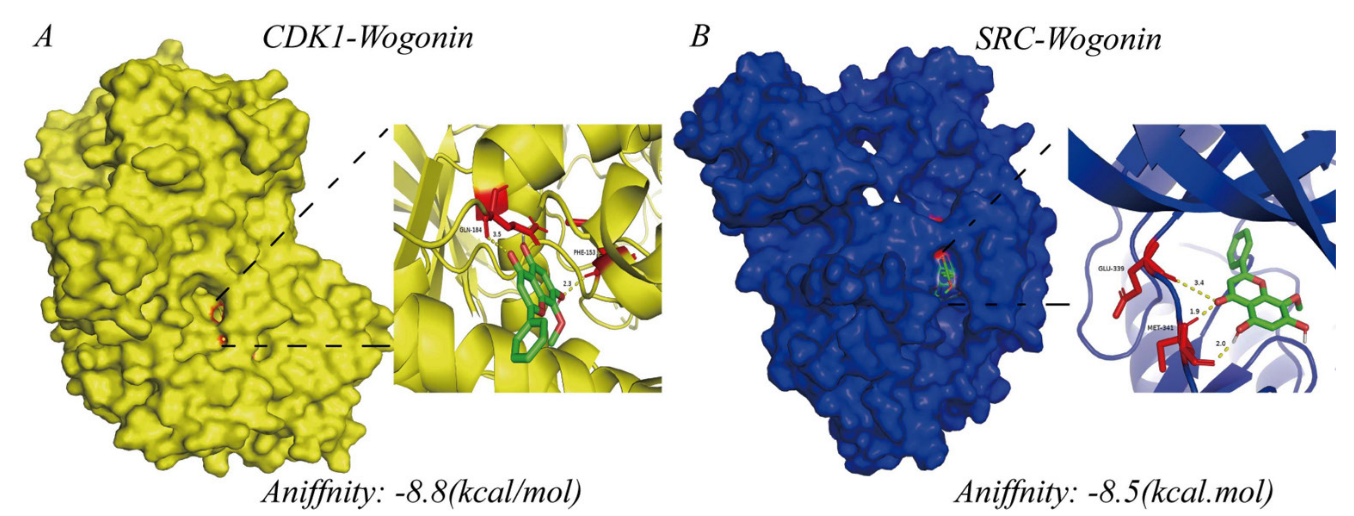
汉黄芩素的 AMDE 特性经过分析，符合小分子化合物类药规则－利平斯基五规则[14]。并且毒性预测结果显示无肝毒性、致癌性、致突变性、细胞毒性、免疫毒性，具有开发为药物的潜力。通过对汉黄芩素干预肝细胞癌的 TOP10 的核心靶点进行分析后，既往研究表明，AKT1 缺失能够阻止小鼠肿瘤的形成[15]。CCND1 沉默能够抑制肝癌干细胞的分化[16-17]。TP53 突变导



注：A 为 GO 富集分析，B 为 KEGG 富集分析。

图 7 药物－疾病交集基因富集分析

Figure 7 Drug-disease intersection gene enrichment analysis



注：A 为 CDK1- 汉黄芩素，结合能：-8.8 kcal/mol；B 为 SRC- 汉黄芩素，结合能：-8.5 kcal/mol。

图 8 药物－靶点分子对接可视化示意图

Figure 8 Visualization diagram of drug-target molecular docking



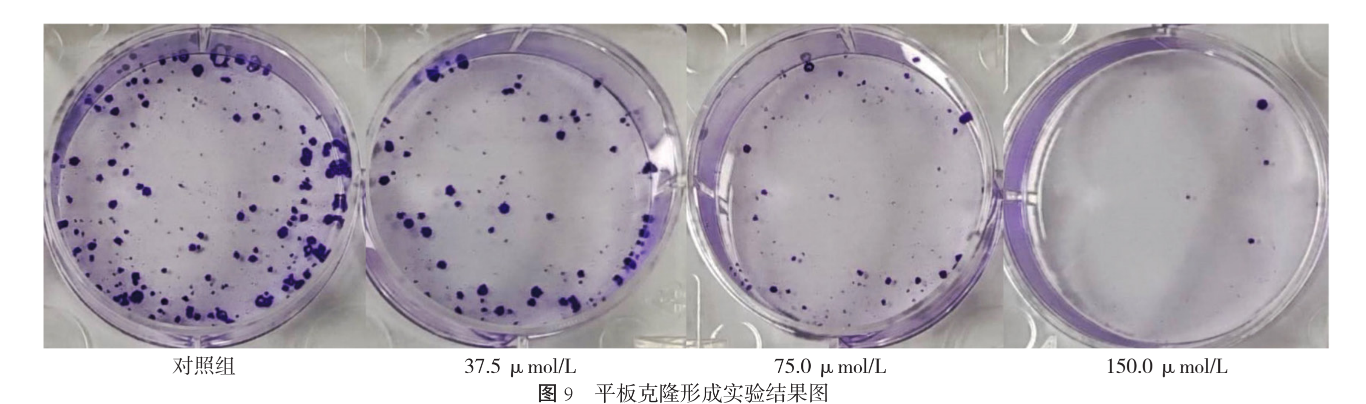


图 9 平板克隆形成实验结果图

Figure 9 Plate clone formation experiment results

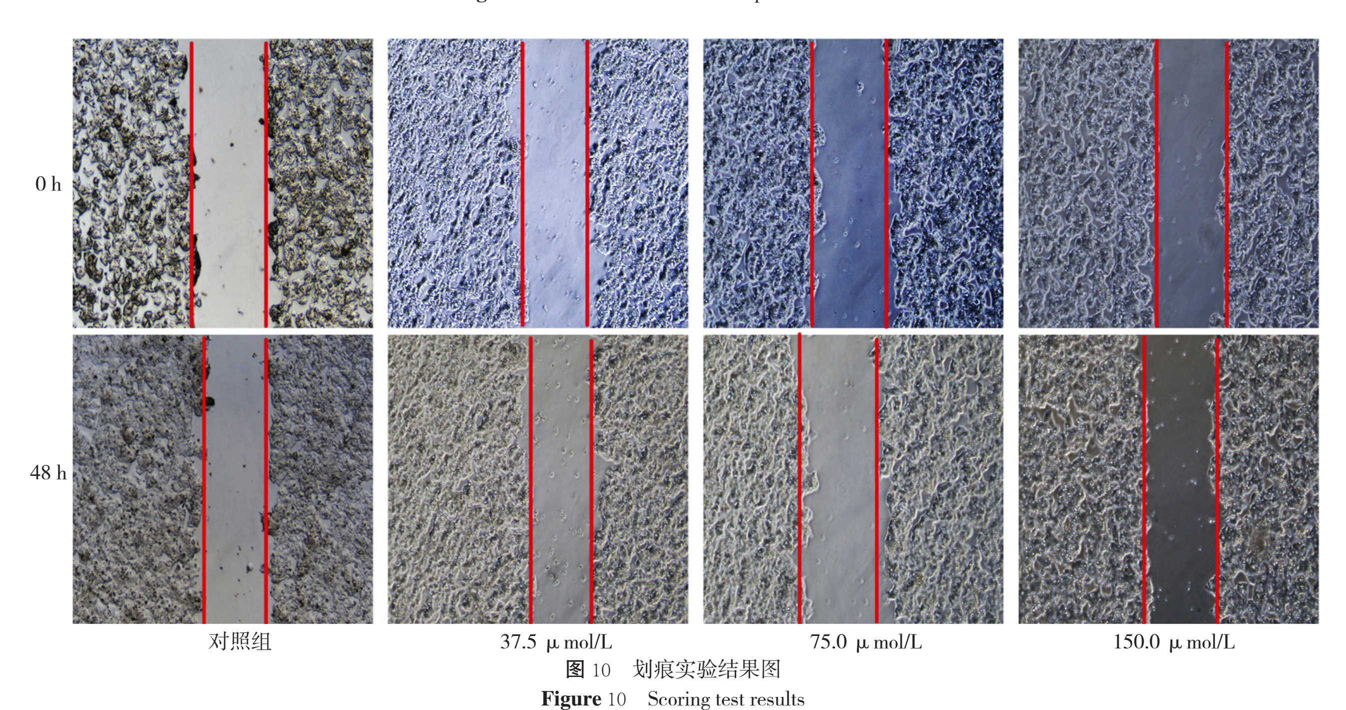


图 10 划痕实验结果图

Figure 10 Scoring test results

表 5 HepG2 细胞克隆形成集落数比较（$\bar{x} \pm s$）

Table 5 Comparison of clone-forming colonies in HepG2 cells

组别	例数	HepG2 细胞克隆形成数
0	3	95.67 ± 4.51
37.5 μ mol/L	3	74.00 ± 3.00[a]
75.0 μ mol/L	3	39.67 ± 2.52[a]
150.0 μ mol/L	3	9.67 ± 2.52[a]
F 值		410.0
P 值		<0.000 1

注：[a] 表示与对照组相比 $P<0.05$。

表 6 汉黄芩素处理后细胞迁移率比较（$\bar{x} \pm s$）

Table 6 Comparison of cell migration rate after wogonin treatment

组别	例数	HepG2 细胞迁移率
0	3	33.83 ± 3.05
37.5 μ mol/L	3	18.98 ± 0.45[a]
75.0 μ mol/L	3	8.54 ± 2.39[a]
150.0 μ mol/L	3	5.06 ± 1.89[a]
F 值		106.7
P 值		<0.0001

注：[a] 表示与对照组相比 $P<0.05$。

致免疫应答下调与肝细胞癌预后相关[18-20]。通过沉默 CDKN1A 能够促进肝细胞癌的增殖和迁移[21-22]。CDK1 在肝细胞癌中高表达并且与不良预后相关，下调 CDK1 的表达，能够抑制肝细胞癌细胞的增殖，迁移和诱导凋亡[23-25]。SRC 高表达促进肝细胞癌的进展，抑制 SRC 的表达，肝癌细胞的增殖受到明显的抑制[26-28]。KEGG 富集分析结果中，IL-7 信号通路能促进肝细胞癌的进展，通过影响 IL-7 信号通路能抑制 HCC 细胞的增殖[29-30]。通过靶向 p53 信号通路能够调控肝细胞癌的发生和进展[31-32]。PI3K/AKT 信号通路与细胞的增殖，迁移，凋亡等方面相关，在癌症中被异常激活，与肿瘤的发生和进展有关，靶向 PI3K/AKT 信号通路是癌症治疗的有效策略[33-34]。在网络药理学分析中发现 CDK1、SRC 两个核心靶点的 mRNA 表达水平在肝

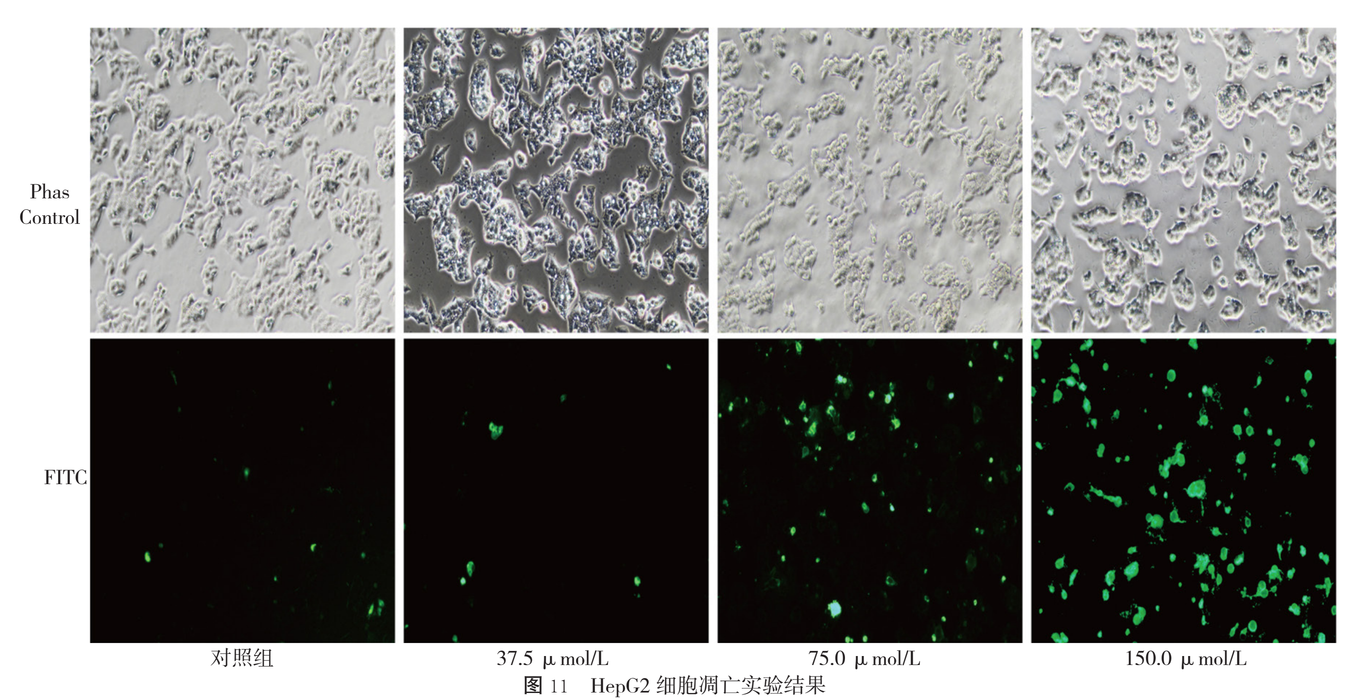


图 11 HepG2 细胞凋亡实验结果

Figure 11 The results of HepG2 cell apoptosis experiment

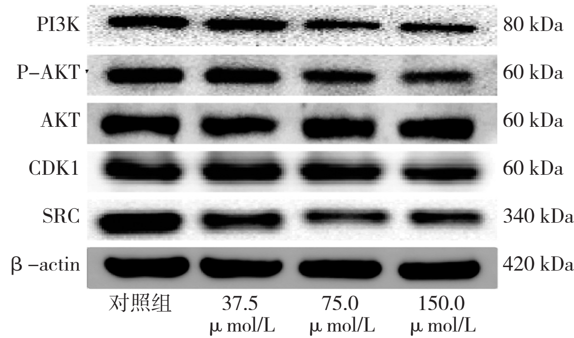


图 12 汉黄芩素下调核心靶点 SRC，CDK1 蛋白表达水平和降低 PI3K/AKT 通路信号

Figure 12 Wogonin down-regulates the expression of core targets of SRC，CDK1 protein and decreases PI3K/AKT pathway signaling

细胞癌组织显著高于正常肝组织，并且在肝癌患者中，CDK1、SRC 的高表达与不良生存预后相关。PI3K/AKT 信号通路富集到的基因数量最多。

体外实验证明，一定浓度范围内的汉黄芩素能够抑制人肝癌细胞株 HepG2 的增殖能力，并且在一定浓度范围内对人正常肝细胞株 LO_2 的增殖抑制能力小于癌细胞，说明汉黄芩素对肝癌细胞的抑制能力具有特异性。划痕实验和凋亡实验表明，汉黄芩素能够抑制肝癌细胞的迁移和诱导肝癌细胞凋亡。通过 WB 实验结果发现，汉黄芩素处理 HepG2 细胞后，核心靶点 CDK1、SRC 的表达量降低，PI3K/AKT 信号通路信号减弱。

结合体外实验和以前的文献研究，汉黄芩素可能为通过抑制核心基因 CDK1、SRC 的表达和减弱 PI3K/AKT 通路信号，然后抑制肝癌细胞增殖、迁移和诱导细胞凋亡，达到干预肝细胞癌发生和进展的目的。结合网络药

表 7 HepG2 细胞 PI3K/AKT 信号通路和 CDK1、SRC 蛋白表达（$\bar{x} \pm s$）

Table 7 PI3K/AKT signaling pathway and CDK1，SRC protein expression levels in HepG2 cells

组别	例数	PI3K	P-AKT/AKT	CDK1	SRC
0	3	0.674±0.021	1.141±0.178	0.716±0.121	0.747±0.065
37.5 μmol/L	3	0.610±0.010	0.992±0.156	0.637±0.104	0.709±0.077
75.0 μmol/L	3	0.514±0.059[a]	0.774±0.105[a]	0.454±0.110[a]	0.559±0.037[a]
150.0 μmol/L	3	0.488±0.050[a]	0.686±0.053[a]	0.358±0.037[a]	0.462±0.056[a]
F 值		13.64	7.335	8.324	14.25
P 值		0.0016	0.0110	0.0077	0.0014

注：[a] 表示与对照组相比 $P<0.05$。

理学分析以及体外实验结果，证明汉黄芩素是一个具有潜力开发为肝细胞癌治疗药物的天然化合物，本研究为汉黄芩素治疗肝细胞癌的作用机制进行了初步探索，为汉黄芩素的后期开发利用提供了一定的参考。

局限性：本次研究只对在 mRNA 表达水平在肝癌组织与正常肝组织有显著差异并且与不良生存预后相关的核心基因进行体外实验验证，未对其他核心基因进行深入研究分析。由于实验条件的限制，未能进行体外实验进一步研究汉黄芩素对肝细胞癌发生和进展的干预作用。

作者贡献：杨永峰提出研究思路，指定总体研究目标；杨安银、刘红丽进行数据分析，实验操作以及文章撰写；陈妙洋、郑玉凤、徐志远进行相关文献和资料收集。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] YANG J D，HAINAUT P，GORES G J，et al. A global view



of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16 (10): 589-604. DOI: 10.1038/s41575-019-0186-y

[2] TORIMURA T, IWAMOTO H. Treatment and the prognosis of hepatocellular carcinoma in Asia [J]. Liver Int, 2022, 42 (9): 2042-2054. DOI: 10.1111/liv.15130.

[3] WEN N Y, CAI Y L, LI F Y, et al. The clinical management of hepatocellular carcinoma worldwide: a concise review and comparison of current guidelines: 2022 update[J]. Biosci Trends, 2022, 16(1): 20-30. DOI: 10.5582/bst.2022.01061.

[4] SULLIVAN L B, GUI D Y, VANDER HEIDEN M G. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16 (11): 680-693. DOI: 10.1038/nrc.2016.85.

[5] VALKENBURG K C, DE GROOT A E, PIENTA K J. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15 (6): 366-381. DOI: 10.1038/s41571-018-0007-1.

[6] ROSENBLUM D, JOSHI N, TAO W, et al. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics [J]. Nat Commun, 2018, 9 (1): 1410. DOI: 10.1038/s41467-018-03705-y.

[7] WAITKUS M S, DIPLAS B H, YAN H. Biological role and therapeutic potential of IDH mutations in cancer [J]. Cancer Cell, 2018, 34 (2): 186-195. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.04.011.

[8] BUYEL J F. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents [J]. Biotechnol Adv, 2018, 36 (2): 506-520. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.02.002.

[9] CHENG F X, LIANG H, BUTTE A J, et al. Personal mutanomes meet modern oncology drug discovery and precision health [J]. Pharmacol Rev, 2019, 71 (1): 1-19. DOI: 10.1124/pr.118.016253.

[10] SLIWOSKI G, KOTHIWALE S, MEILER J, et al. Computational methods in drug discovery [J]. Pharmacol Rev, 2013, 66 (1): 334-395. DOI: 10.1124/pr.112.007336.

[11] NOOR F, TAHIR UL QAMAR M, ASHFAQ U A, et al. Network pharmacology approach for medicinal plants: review and assessment [J]. Pharmaceuticals, 2022, 15 (5): 572. DOI: 10.3390/ph15050572.

[12] BANIK K, KHATOON E, HARSHA C, et al. Wogonin and its analogs for the prevention and treatment of cancer: a systematic review [J]. Phytother Res, 2022, 36 (5): 1854-1883. DOI: 10.1002/ptr.7386.

[13] GU Y Q, ZHENG Q, FAN G F, et al. Advances in anti-cancer activities of flavonoids in Scutellariae radix: perspectives on mechanism [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (19): 11042. DOI: 10.3390/ijms231911042.

[14] LIPINSKI C A, LOMBARDO F, DOMINY B W, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 46 (1/2/3): 3-26. DOI: 10.1016/s0169-409x (00) 00129-0.

[15] XU Z, XU M, LIU P, et al. The mTORC2-Akt1 cascade is crucial for c-myc to promote hepatocarcinogenesis in mice and humans [J]. Hepatology, 2019, 70 (5): 1600-1613. DOI: 10.1002/hep.30697.

[16] ZHANG H Y. CCND1 silencing suppresses liver cancer stem cell differentiation through inhibiting autophagy [J]. Hum Cell, 2020, 33 (1): 140-147. DOI: 10.1007/s13577-019-00295-9.

[17] DING H, WANG Y J, ZHANG H Y. CCND1 silencing suppresses liver cancer stem cell differentiation and overcomes 5-Fluorouracil resistance in hepatocellular carcinoma [J]. J Pharmacol Sci, 2020, 143 (3): 219-225. DOI: 10.1016/j.jphs.2020.04.006.

[18] SHI L, CAO J, LEI X, et al. Multi-omics data identified TP53 and LRP1B as key regulatory gene related to immune phenotypes via EPCAM in HCC [J]. Cancer Med, 2022, 11 (10): 2145-2158. DOI: 10.1002/cam4.4594.

[19] LONG J Y, WANG A Q, BAI Y, et al. Development and validation of a TP53-associated immune prognostic model for hepatocellular carcinoma [J]. EBioMedicine, 2019, 42: 363-374. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.03.022.

[20] YANG H Y, SUN L J, GUAN A, et al. Unique TP53 neoantigen and the immune microenvironment in long-term survivors of Hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Immunol Immunother, 2021, 70 (3): 667-677. DOI: 10.1007/s00262-020-02711-8.

[21] LUO X E, ZHOU N, WANG L, et al. Long noncoding RNA GATA3-AS1 promotes cell proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by suppression of PTEN, CDKN1A, and TP53 [J]. Can J Gastroenterol Hepatol, 2019, 2019: 1389653. DOI: 10.1155/2019/1389653.

[22] LI B, LI A, YOU Z, et al. Epigenetic silencing of CDKN1A and CDKN2B by SNHG1 promotes the cell cycle, migration and epithelial-mesenchymal transition progression of hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2020, 11 (10): 823. DOI: 10.1038/s41419-020-03031-6.

[23] ZHOU J, HAN S, QIAN W C, et al. Metformin induces miR-378 to downregulate the CDK1, leading to suppression of cell proliferation in hepatocellular carcinoma [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 4451-4459. DOI: 10.2147/OTT.S167614.

[24] LIU H M, TAN H Y, LIN Y, et al. microRNA-1271-5p inhibits cell proliferation and enhances radiosensitivity by targeting CDK1 in hepatocellular carcinoma [J]. J Biochem, 2020, 167 (5): 513-524. DOI: 10.1093/jb/mvz114.

[25] YIN S S, YANG S S, LUO Y M, et al. Cyclin-dependent kinase 1 as a potential target for lycorine against hepatocellular carcinoma [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 193: 114806. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114806.

[26] LIU Z, WANG Y, YAO Y T, et al. Quantitative proteomic and phosphoproteomic studies reveal novel 5-fluorouracil resistant targets in hepatocellular carcinoma [J]. J Proteomics, 2019, 208: 103501. DOI: 10.1016/j.jprot.2019.103501.

[27] JIN A L, ZHANG C Y, ZHENG W J, et al. CD155/SRC complex promotes hepatocellular carcinoma progression via inhibiting the p38 MAPK signalling pathway and correlates with poor prognosis [J]. Clin Transl Med, 2022, 12 (4): e794. DOI: 10.1002/ctm2.794.

[28] ZHANG X, XU H, BI X Y, et al. Src acts as the target of matrine to inhibit the proliferation of cancer cells by regulating phosphorylation signaling pathways [J]. Cell Death Dis, 2021,

12（10）：931. DOI：10.1038/s41419-021-04221-6.
[29] MA H Y，YAMAMOTO G，XU J，et al. IL-17 signaling in steatotic hepatocytes and macrophages promotes hepatocellular carcinoma in alcohol-related liver disease [J]. J Hepatol，2020，72（5）：946-959. DOI：10.1016/j.jhep.2019.12.016.
[30] TANG B F，ZHU J Y，LI J，et al. The ferroptosis and iron-metabolism signature robustly predicts clinical diagnosis，prognosis and immune microenvironment for hepatocellular carcinoma [J]. Cell Commun Signal，2020，18（1）：174. DOI：10.1186/s12964-020-00663-1.
[31] WANG G G，LI J H，YAO Y，et al. Small nucleolar RNA 42 promotes the growth of hepatocellular carcinoma through the p53 signaling pathway [J]. Cell Death Discov，2021，7（1）：347. DOI：10.1038/s41420-021-00740-5.
[32] XU B，WEI Y G，LIU F，et al. Long noncoding RNA CERS6-AS1 modulates glucose metabolism and tumor progression in hepatocellular carcinoma by promoting the MDM2/p53 signaling pathway [J]. Cell Death Discov，2022，8（1）：348. DOI：10.1038/s41420-022-01150-x.
[33] TEWARI D，PATNI P，BISHAYEE A，et al. Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer：a novel therapeutic strategy [J]. Semin Cancer Biol，2022，80：1-17. DOI：10.1016/j.semcancer.2019.12.008.
[34] HE Y，SUN M M，ZHANG G G，et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. Signal Transduct Target Ther，2021，6（1）：425. DOI：10.1038/s41392-021-00828-5.

（收稿日期：2023-04-04；修回日期：2023-08-19）
（本文编辑：贾萌萌）